# MycAssay™ Aspergillus
## Cepheid SmartCycler®
## Amostras Respiratórias
**REF 080-045**

## Utilização prevista

O MycAssay™ Aspergillus está indicado para a utilização por profissionais de laboratório qualificados para a detecção qualitativa do DNA genómico de *Aspergillus* spp. extraído de amostras respiratórias do tracto respiratório inferior (p. ex., amostras brônquicas) como ajuda no diagnóstico em doentes adultos com suspeita de infecção ou alergia por *Aspergillus*.

O MycAssay™ Aspergillus foi validado para a utilização com o Cepheid SmartCycler® (utilizando as versões de software Dx 1.7b e 3.0).

## Resumo e explicação

*Aspergillus* spp. são fungos ubíquos e oportunistas que provocam tanto síndromas alérgicas como invasivas. O género é abrangido por, aproximadamente, 300 espécies, das quais 41 foram associadas à doença humana. A maioria das infecções é causada por *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus* e *A. niger;* com menor frequência foram implicados *A. nidulans* e outras espécies raras tais como *A. sydowii, A. versicolor, A. lentulus e A. pseudofischeri* [1]. A maioria das infecções e alergias causadas por *Aspergillus* spp. afecta o tracto respiratório. As síndromas alérgicas incluem aspergilose boncopulmonar (ABPA) e sinusite *Aspergillus* alérgica e são habitualmente causadas por *A. fumigatus*. A aspergilose pulmonar crónica inclui aspergiloma, aspergilose pulmonar cavitária crónica e aspergilose fibrótica crónica. A aspergilose invasiva (AI) ocorre em grupos de doentes em risco, incluindo doentes tratados com corticosteróides e doentes com neutropenia ou disfunção fagocitária (i.e., doença granulomatosa crónica e infecção por HIV). Cerca de 80% dos casos de aspergilose invasiva envolve os pulmões[2].

O diagnóstico de rotina da aspergilose pulmonar invasiva inclui tomografia computorizada (TAC), broncoscopia e lavagem broncoalveolar (microscopia e cultura), análises sanguíneas de antigénios de *Aspergillus* ou exame histológico de amostras de biopsia cirúrgica. Neste cenário, as culturas são com frequência falsamente negativas[3]. De facto, a lavagem broncoalveolar só é positiva por cultura em aproximadamente 40% dos casos, mesmo quando o diagnóstico é provado por outros meios [4,5,6,7], demonstrando a falta de sensibilidade da cultura na detecção da aspergilose invasiva e da aspergilose pulmonar crónica. As culturas são, no entanto, importantes se forem positivas uma vez que muitos testes de diagnóstico não indicam o género ou a espécie do fungo que causa a doença ou o perfil de susceptibilidade do isolado que causa a infecção.

A aspergilose broncopulmonar complica a asma e a fibrose quística[8] e pode, raramente, apresentar-se sem doenças subjacentes. A maioria dos casos está associada a *A. fumigatus*, com outros fungos implicados ocasionalmente. A obstrução episódica das vias aéreas com tampões de esputo espesso de *Aspergillus* hyphae, IgE total sérica >1000 UI/mL e anticorpos IgE e IgG específicos de *Aspergillus fumigatus* detectáveis ou um teste de punção cutânea positivo para *Aspergillus* são as características da doença. As culturas de esputo podem ser positivas para *A. fumigatus* e podem ser observadas bronquiectasia numa TAC do tórax.

Os meios actuais de diagnóstico da aspergilose pulmonar crónica são uma mistura de radiologia (que não é específica)[9] e serologia (anticorpos IgC contra *Aspergillus* ou precipitinas), que é positiva na maioria das formas de aspergilose (e, por conseguinte, não é específica para qualquer manifestação particular de aspergilose)[1]. As culturas são positivas em

[1] Species Database in www.aspergillus.org.uk
[2] Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. (2005). The invasive and saprophytic syndromes due to *Aspergillus* spp. Medical Mycology: 43 (suppl. 1): S207-38.
[3] Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. (2005). Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. Lancet Infectious Diseases: 9: 609-22.
[4] Levy H, Horak DA, Tegtmeier BR, Yokota SB, Forman SJ. (1992). The value of bronchoalveolar lavage and bronchial washings in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. Respir Med: 86: 243-8.
[5] Greub G and Bille J. (1998) Aspergillus species isolated from clinical specimens: suggested clinical and microbiological criteria to deteremine significance. Clin Microbiol Infect 4: 710-716.
[6] Perfect JR, Cox GM, Lee JY, Kauffman CA, de Repentigny L,Chapman SW, Morrison VA, Pappas P, Hiemenz JW, Stevens DA, and the Mycoses Study Group. (2001). The impact of culture isolation of *Aspergillus* species: A hospital-based survey of Aspergillosis. Clinical Infectious Diseases; 33:1824–33.
[7] Maertens J, Van Eldere J, Verhaegen J, Verbeken E, Verschakelen J, Boogaerts M. (2002). Use of Circulating Galactomannan Screening for Early Diagnosis of Invasive Aspergillosis in Allogeneic Stem Cell Transplant Recipients The Journal of Infectious Diseases. 186:1297–306.
[8] Tillie-Leblond I, Tonnel AB. (2005). Allergic bronchopulmonary aspergillosis. Allergy: 60: 1004-13.
[9] Greene R. (2005). The radiological spectrum of pulmonary aspergillosis. Med Mycol: 43 (Suppl 1): S147-54.

apenas 40-65% dos casos provados por radiologia e serologia[10,11]. Uma vez que o diagnóstico diferencial é amplo, incluindo tuberculose, micobacteriose atípica, sarcoidose, histoplasmose, coccidioidomicose, pneumoconiose, pulmão reumatóide, espondilite anquilosante e outras, a documentação da presença de *Aspergillus* spp. nas amostras respiratórias é importante para evitar o atraso no diagnóstico da aspergilose pulmonar e o tratamento incorrecto.

MycAssay™ Aspergillus é um kit de diagnóstico molecular para a detecção do DNA genómico de Aspergillus spp. com base na tecnologia de PCR com sinais moleculares (*Molecular Beacon*)[12]. Todo o procedimento de análise, incluindo a extracção de DNA da amostra clínica, pode ser terminado em 4 horas, comparativamente à cultura fúngica que pode demorar vários dias a produzir resultados positivos. Este ensaio oferece vantagens sobre os métodos de diagnóstico actualmente disponíveis para a aspergilose invasiva aguda e a aspergilose pulmonar crónica. Estas vantagens incluem uma detecção mais rápida de *Aspergillus* spp. e o potencial de um aumento da sensibilidade a *Aspergillus* spp. em doentes altamente imunocomprometidos com suspeita de aspergilose pulmonar invasiva.

## Princípios do procedimento

A seguir à mistura dos reagentes no kit MycAssay™ Aspergillus com uma amostra contendo a sequência de DNA alvo de *Aspergillus* (uma porção do gene 18S ribossómico de *Aspergillus*), a termociclagem resulta na ocorrência da amplificação do DNA. O ensaio também contém um Controlo de Amplificação Interno (IAC), um fragmento de DNA não presente em genomas de Aspergillus, outros genomas fúngicos, bacterianos ou humanos, para detectar substâncias inibitórias da PCR e confirmar a funcionalidade dos reagentes do ensaio.

Os alvos de DNA amplificados são detectados com a tecnologia de sinais moleculares. Os sinais moleculares são amostras de hibridização de oligonucleótidos de cadeia única que formam uma estrutura de haste e ansa (*stem-and-loop*). A ansa contém uma sequência de amostras que é complementar à sequência alvo, e a haste é formada pela ligação de sequências de braço complementares que se encontram localizadas de ambos os lados da sequência de amostras. Um fluoróforo, que fluoresce quando excitado por luz com o comprimento de onda apropriado, é ligado covalentemente à extremidade de um braço e um supressor, que suprime a fluorescência do fluoróforo quando se encontra em grande proximidade física, é ligado covalentemente à extremidade do outro braço. Os sinais moleculares não entram em fluorescência quando se encontram livres na solução. No entanto, quando se hibridizam a uma cadeia de ácido nucleico que contém uma sequência alvo, são submetidos a uma alteração conformacional que separa o fluoróforo e o supressor fisicamente, possibilitando-lhes entrarem em fluorescência em consequência da excitação. A quantidade de fluorescência em qualquer ciclo, ou a seguir ao ciclo, depende da quantidade de produtos da amplificação presentes nessa altura. O sistema de PCR em Tempo Real SmartCycler monitoriza simultaneamente a fluorescência emitida por cada sinal.

## Precauções

- O kit destina-se a ser utilizado apenas por profissionais de laboratório. Os procedimentos são necessários para manipulações não aerossol de amostras. As precauções normais e as directrizes institucionais devem ser seguidas no manuseamento de todas as amostras. A Myconostica Ltd. disponibiliza uma Ficha de dados de segurança do material.
- Este teste destina-se apenas a utilização diagnóstica *in vitro*.
- Esta análise destina-se apenas a ser utilizada em combinação com o sistema Cepheid SmartCycler® e o software Dx Diagnostic nas versões 1.7b e 3.0.
- Não utilize reagentes ou controlos se as bolsas protectoras estiverem abertas ou quebradas à chegada.
- Os reagentes e os controlos não são intercambiáveis entre kits com números de lote diferentes.
- Nunca junte reagentes ou controlos de tubos diferentes mesmo que pertençam ao mesmo lote.
- Nunca utilize reagentes ou controlos após o seu prazo de validade.
- Os reagentes e os controlos nunca devem voltar a ser congelados ou reutilizados após a abertura.
- Use roupas protectoras e luvas descartáveis enquanto manipular os kits de reagentes.
- Evite a contaminação microbiana e com desoxirribonuclease (DNAse) dos reagentes ao remover as alíquotas dos tubos.
- Recomenda-se a utilização de pontas de pipetas com filtro de baixa retenção descartáveis isentas de DNAse ou pontas de pipetas de deslocamento positivo.
- Utilize uma nova ponta para cada amostra ou reagente.

[10] Denning DW, Riniotis K, Dobrashian R, Sambatakou H. (2003). Chronic cavitary and fibrosing pulmonary and pleural aspergillosis: Case series, proposed nomenclature and review. Clin Infect Dis: 37 (Suppl 3): S265-80.
[11] Camuset J, Lavolé A, Wislez M, Khalil A, Bellocq A, Bazelly B, Mayaud C, Cadranel J. (2007). Bronchopulmonary aspergillosis infections in the non-immunocompromised patient. Rev Pneumol Clin. 63:155-166.
[12] Tyagi S, Kramer FR. (1996). Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hybridization. Nature Biotechnology: 14: 303-308.

- Elimine os reagentes não utilizados e os resíduos de acordo com os regulamentos nacionais, federais, estatais e locais.
- Para evitar a contaminação com produtos de amplificação de *Aspergillus* ou IAC, não abra os tubos de reacção após a amplificação.
- Podem ser analisados controlos adicionais de acordo com as directrizes ou os regulamentos de organização locais, estatais, provinciais, federais ou acreditadas.
- Não coma, beba nem fume nas áreas em que as amostras e os reagentes dos kits são manuseados.
- Concentrações baixas de DNA podem ser instáveis se não forem conservadas correctamente. Recomenda-se que as extracções de DNA de amostras clínicas sejam conservadas a -80 °C para preservar a sua integridade. Múltiplos ciclos de descongelação e recongelação devem ser igualmente evitados sempre que possível.

## Conteúdo do kit

Descrição

O kit consiste em cinco bolsas de folha seladas com 3 compartimentos, podendo ser cada uma delas removida da caixa e utilizada separadamente. Cada bolsa contém reagentes suficientes para 8 reacções.

| | | Volume |
|---|---|---|
| **Tubo 1** | dNTPs | 66 µL |
| (Tampa cor-de-laranja) | $MgCl_2$ | |
| | Solução tamponada com complexo de DNA polimerase | |
| **Tubo 2** | <0,01% primários | 66 µL |
| (Tampa verde) | <0,01% sinais moleculares | |
| | <0,0001% Controlo de Amplificação Interno (CAI) | |
| | O Controlo de Amplificação Interno é um plasmídeo de DNA recombinante que abriga uma sequência não-infecciosa não relacionada com a sequência alvo (*Aspergillus*) | |
| | Tampão Tris-HCl | |
| **Tubo 3** | Controlo negativo | 25 µL |
| (Tampa transparente) | Água | |
| **Tubo 4** | Controlo positivo | 25 µL |
| (Tampa preta) | <0,0001% DNA de controlo positivo | |
| | A molécula do controlo positivo é um plasmídeo recombinante que abriga a sequência alvo *Aspergillus* | |
| | Tampão Tris-HCl | |

O kit contém igualmente:

- CD-ROM do Protocolo do MycAssay™ Aspergillus Myconostica
- Instruções de utilização
- Certificado de análise

## Conservação

O kit deve ser conservado congelado (-15 a -25 °C) até ao prazo de validade indicado no rótulo da caixa do kit, momento em que deve ser eliminado em conformidade com as regulamentações locais.

Uma vez aberta uma bolsa, o conteúdo deve ser utilizado imediatamente, sem voltar a congelar nem reutilizar posteriormente.

## Materiais/equipamentos necessários mas não fornecidos

A. Equipamento necessário
- Sistema de PCR em Tempo Real SmartCycler® (incluindo o manual do utilizador, o computador em anexo e o software Dx Diagnostic SmartCycler®, versões 3.0 ou 1.7b)
- Tubos de reacção SmartCycler®
- Minicentrífuga adaptada aos tubos de reacção SmartCycler®
- Prateleira de suporte em plástico para tubos de reacção SmartCycler®

B. Equipamento geralmente necessário
- Microcentrífuga
- Agitador vórtice
- Micropipetas (volumes necessários 7,5 µL – 20 µL)
- Pontas de filtro de baixa retenção estéreis
- Luvas descartáveis, sem pó
- Solução de descontaminação de DNA patenteada
- Caneta marcadora permanente
- Kit de isolamento de DNA (ver em baixo)

## Amostra

A amostra para o ensaio MycAssay™ Aspergillus é DNA genómico total extraído de amostras clínicas de LBA e de outras amostras das vias respiratórias inferiores. Para este efeito recomenda-se o seguinte kit de isolamento e equipamento, que foi utilizado durante a validação:

- Kit de **Extracção** de DNA Fúngico MycXtra™ (REF: 080-005 disponibilizado pela Myconostica)
- Vortex-Genie 2 (Scientific Industries Inc., New York, USA)
- Placa de adaptação para vórtice (REF: 080-015 disponibilizado pela Myconostica)

## Observações metodológicas

- Leia todo o protocolo antes de começar.
- O processo completo do MycAssay™ Aspergillus (excluindo a extracção de DNA) demora aproximadamente 2 horas, dependendo do número de amostras analisadas.
- A preparação da análise deve ser efectuada numa estação de trabalho de PCR ou num laboratório pré-PCR. Se não houver uma estação de trabalho de PCR disponível, a análise deve ser preparada numa área específica do laboratório[13], separada de áreas utilizadas para extracção de DNA, que seja regularmente limpa com reagentes de descontaminação de DNA.
- No entanto, evite utilizar reagentes de descontaminação de DNA durante a preparação da PCR em tempo real uma vez que podem interferir com o ensaio.
- Utilize micropipetas para transferência de fluidos. Para a preparação destas reacções devem ser utilizadas micropipetas específicas que devem ser regularmente descontaminadas.
- Recomenda-se a utilização de pontas de filtro de baixa retenção para assegurar que nenhum DNA é perdido durante a preparação do procedimento.
- **Proceda com precaução ao manipular o Tubo 4. Este contém material de controlo positivo de DNA, e uma contaminação pode dar origem a resultados de análise positivos falsos.**
- Use sempre luvas.
- Todos os tubos de reagente devem ser tapados a seguir à utilização e antes da sua eliminação.
- Tenha o cuidado de identificar devidamente os tubos de reacção SmartCycler® quando processar amostras de vários doentes.
- Tenha cuidado ao seleccionar o ficheiro de protocolo da execução: seleccione APENAS **MycAssay Aspergillus Dx1,7b v1.3** ou **MycAssay Aspergillus v1_3**; NÃO seleccione **SERUM MycAssay Asp v1**.

[13] Vide por exemplo, Mifflin, T. E. (2003). Setting up a PCR Laboratory. *em* PCR Primer, 2ª Ed. (eds. Dieffenbach and Dveksler). Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY. EUA.

## Procedimento para a utilização

### 1. Preparação da PCR em tempo real

1.1 Para começar, ligue o sistema de PCR em Tempo Real (equipamento e computador associado). Introduza os nomes de utilizador e as palavras-passe conforme exigido.

1.2 Assegure-se de que a área de trabalho foi limpa com reagentes de descontaminação de DNA e deixe secar completamente; evite utilizá-los durante a preparação do ensaio uma vez que o excesso de solução de limpeza pode inibir as reacções de PCR.

1.3 Cada bolsa contém um tubo de cada Tubo 1, Tubo 2, Tubo 3 e Tubo 4. Em cada bolsa existem reagentes suficientes para executar 8 reacções. Devem ser realizadas, pelo menos, uma reacção com controlo positivo e uma reacção com controlo negativo por execução em que os reagentes são de um único kit. Por conseguinte, uma bolsa pode analisar 6 amostras de doentes. Se for necessário analisar mais de 6 amostras, pode utilizar-se mais de uma bolsa se as bolsas utilizadas forem do mesmo lote. Pode ser analisado um máximo de 38 amostras de doente utilizando as 5 bolsas do kit.

1.4 Calcule o número de reacções necessárias consultando a tabela abaixo:

| Número de bolsas | Número máximo de amostras de doente |
|---|---|
| 1 | 6 |
| 2 | 14 |
| 3 | 22 |
| 4 | 30 |
| 5 | 38 |

1.5 Retire o número adequado de bolsas do congelador. Não utilize bolsas que já não estejam seladas. Se as amostras de doentes tiverem sido congeladas após a extracção, remova-as igualmente do congelador.

1.6 Abra o número necessário de bolsas e retire os tubos. Se for utilizada mais de uma bolsa, mas se for executado apenas um conjunto de controlos positivos e negativos, só é necessário retirar os Tubos 3 e 4 de uma das bolsas. **Proceda com precaução ao manipular o Tubo 4. Este contém material de controlo positivo de DNA, e uma contaminação pode dar origem a resultados de análise positivos falsos.**

1.7 Deixe o conteúdo dos tubos descongelar colocando-os sobre a bancada do laboratório durante 5-10 minutos, assegurando-se que o conteúdo de cada tubo descongela antes de prosseguir. Agite o conteúdo dos tubos e as amostras de doentes no vórtice; prossiga com uma breve centrifugação numa microcentrífuga para garantir a acumulação de todo o conteúdo no fundo dos tubos antes de utilizar.

1.8 Coloque o número necessário de tubos de reacção SmartCycler® na(s) respectivas prateleira(s) de suporte. Tenha cuidado em tocar com as mãos apenas o pescoço dos tubos de reacção.

1.9 Prepare sempre primeiro o controlo negativo, seguido pelas amostras do doente. O controlo positivo deve ser sempre preparado em último lugar.

1.10 Os volumes de reagente e de DNA são apresentados na seguinte tabela:

| Reagente | Reacção | | |
|---|---|---|---|
| | Controlo negativo | Amostra do doente | Controlo positivo |
| **Tubo 1 (tampa cor-de-laranja)** | 7,5 µL | 7,5 µL | 7,5 µL |
| **Tubo 2 (tampa verde)** | 7,5 µL | 7,5 µL | 7,5 µL |
| **Tubo 3 (tampa transparente)** | 10 µL | - | - |
| **Amostra do doente** | - | 10 µL | - |
| **Tubo 4 (tampa preta)** | - | - | 10 µL |
| Volume total | 25 µL | 25µL | 25 µL |

1.11 Adicione os reagentes na ordem apresentada na tabela anterior; o Tubo 1, em seguida o Tubo 2, seguido pelo padrão (controlo negativo, amostra do doente ou controlo positivo). Tome cuidado ao retirar alíquotas do Tubo 1; o líquido é ligeiramente viscoso e pode aderir à aresta interna do tubo. Se isto acontecer, volte a centrifugar para acumular o conteúdo final na base do tubo antes de tentar remover as alíquotas finais.

1.12 Utilize uma nova ponta de pipeta para cada transferência de líquido. Volte a tapar cada tubo de reagente a seguir à utilização e elimine-o imediatamente, assim como todo o conteúdo restante, num recipiente de resíduos clínicos que possa ser selado. Os reagentes não utilizados não podem ser guardados para utilização posterior.

1.13 Tenha um cuidado adicional ao pipetar o Tubo 4 (controlo positivo de DNA) para assegurar que não contamina outro tubo de reacção. Fechar as tampas dos outros tubos de reacção antes de abrir o Tubo 4 pode reduzir o risco de contaminação cruzada.

1.14 Certifique-se de que todas as tampas dos tubos de reacção estão firmemente fechadas e, em seguida, rotule cada tampa utilizando uma caneta marcadora permanente, p.ex., POS para controlo positivo, NEG para controlo negativo, e o ID do doente para as amostras do doente. Centrifugue os tubos de reacção durante 10 segundos com a mini-centrífuga especificamente adaptada. Inspeccione visualmente se existem bolhas nas misturas da reacção.

1.15 Avance imediatamente para a Secção 2. As reacções do MycAssay™ Aspergillus permanecem estáveis na bancada durante até 60 minutos.

1.16 A seguir à preparação do PCR, certifique-se de que a área de trabalho volta a ser perfeitamente limpa utilizando reagentes de descontaminação de DNA.

## 2. Realizar a execução

Antes de prosseguir com a secção seguinte, verifique qual a versão de software Dx que está instalada no seu computador. **Abra o software, seleccione Help (Ajuda) da barra de ferramentas e clique em About (Acerca).**

Na versão 1.7b siga as instruções seguintes na Secção 2.1
Na versão 3.0 siga as instruções seguintes na Secção 2.2

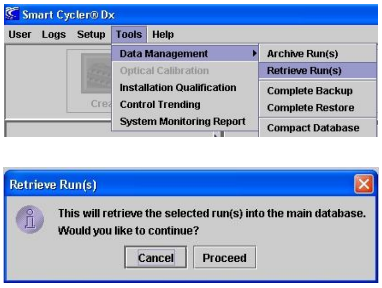
Tome igualmente conhecimento que são necessários determinados privilégios de utilizador no software para **Retrieve Run(s)**ou **Import** um ensaio. Estes só podem ser atribuídos pelo **Administrator** do equipamento.

### 2.1 Software SmartCycler® Dx Diagnostic, versão 1.7d

2.1.1 Abra o software SmartCycler® Dx Diagnostic, versão 1.7b e introduza o seu nome de utilizador e a palavra-passe.

2.1.2 Insira o **CD do protocolo MycAssay Aspergillus Myconostica** e clique no separador **Define Assays** (Definir ensaios).

2.1.3 Vá para **Retrieve Run(s)** (Extrair execução(ões)) através da directoria **Tools** (Ferramentas) na barra do menu superior e clique em **Proceed** (Avançar):




2.1.4 Seleccione o ficheiro **MycAssay Aspergillus Dx1_7bv1_3.DXA** no CD-ROM conforme apresentado abaixo. Este ficheiro deve ser um entre dois reconhecidos pelo software.

2.1.5 No próximo ecrã, seleccione o nome do ficheiro **MycAssay Aspergillus Dx1,7b v1.3** e clique em **OK** e, a seguir, em **Proceed** (Avançar) e **OK**.

2.1.6 Feche o software. Ao ser novamente aberto, o ensaio **Aspergillus Dx1.7b v1.3** estará disponível para uma utilização durante a criação de uma nova execução.

2.1.7 Clique no separador **Create Run** (**Criar execução**). Introduza um **Run Name** (Nome de execução) (recomenda-se que este inclua a data e as iniciais do operador como mínimo) ou deixe um espaço se desejar que o software crie o nome automaticamente.

2.1.8 Seleccione **MycAssay Aspergillus Dx1.7b v1.3** como ensaio.

2.1.9 Introduza o **Lot Number** (Número do lote) e o **Expiration Date** (Prazo de validade) do kit conforme está impresso na caixa do kit e em cada bolsa. O número do lote terá a forma de M-XXXXXXXX.

2.1.10 Introduza o **Number of specimens** na caixa e clique em **Apply** (Aplicar). A **Sample ID** de cada amostra será automaticamente denominada *SPEC* pelo software. Por isso, dê novo nome a cada centro adequadamente para efeitos de identificação; i. e., faça duplo clique em *SPEC* para seleccionar e, em seguida, digite a ID da amostra. O software incluirá automaticamente um controlo positivo e um negativo na execução da PCR em tempo real.

2.1.11 Coloque os tubos de reacção cuidadosamente nos sítios específicos no bloco do SmartCycler® e clique em **Start Run** (Iniciar execução). N.B. Tenha cuidado em colocar os tubos de reacção nos sítios específicos, uma vez que podem não estar na mesma ordem da sua preparação. Faça uma nota do nome da execução e clique em **OK**. A execução iniciar-se-á agora e surgirão luzes vermelhas por cima de cada sítio em utilização no bloco.

2.1.12 Para determinar quanto tempo a execução demorará a terminar, clique no separador **Check Status** (Verificar estado). O nome da execução e o subsequente tempo de execução serão apresentados.

### 2.2 Software SmartCycler® Dx Diagnostic, versão 3.0

2.2.1 Abra o software SmartCycler® Dx Diagnostic, versão 3,0 e introduza o seu nome de utilizador e a palavra-passe.

2.2.2 Insira o **CD-ROM do protocolo MycAssay Aspergillus Myconostica** e clique no separador **Define Assays** (Definir ensaios) e importe o ficheiro **MycAssay Aspergillus v1_3.sca** do CD-ROM.

2.2.3 Clique no separador **Create Run** (**Criar execução**). Introduza um **Run Name** (Nome de execução) (recomenda-se que este inclua a data e as iniciais do operador como mínimo) ou deixe um espaço se desejar que o software crie o nome automaticamente.

2.2.4 Seleccione **MycAssay Aspergillus v1.3** como ensaio.

2.2.5 Introduza o **Lot Number** (Número do lote) e o **Expiration Date** (Prazo de validade) do kit conforme está impresso na caixa do kit e em cada bolsa. O número do lote terá a forma de M-XXXXXXXX.

2.2.6 Introduza a ID (amostra) do doente na caixa **Patient (Sample) ID** e o número de amostras (réplicas) nas caixas **Number of specimens** apropriadas e clique em **Apply**. Faça isto para todas as amostras a analisar. O software incluirá automaticamente um controlo positivo e um negativo na execução da PCR em tempo real.

2.2.7 Coloque os tubos de reacção cuidadosamente nos sítios específicos no bloco do SmartCycler® e clique em **Start Run** (Iniciar execução). N.B. Tenha cuidado em colocar os tubos de reacção nos sítios específicos, uma vez que podem não estar na mesma ordem da sua preparação. Faça uma nota do nome da execução e clique em **OK**. A execução iniciar-se-á agora e surgirão luzes vermelhas por cima de cada sítio em utilização no bloco.

2.2.8 Para determinar quanto tempo a execução demorará a terminar, clique no separador **Check Status** (Verificar estado). O nome da execução e o subsequente tempo de execução serão apresentados.

## 3. Análise e interpretação de dados

3.1 Os resultados podem ser visualizados no software Dx seleccionando o separador **View Results** (**Visualizar resultados**).

3.2 Clique no botão **View Another Run** (**Visualizar outra execução**) no fundo da página, seleccione a execução que deseja visualizar e, em seguida, clique em **OK**.

3.3 Os **Patient Results** já devem estar seleccionados na lista **Views** (Visualizações). A ID (amostra) de doente e o resultado do ensaio subsequente estarão claramente apresentados. Os resultados podem ser interpretados mediante a tabela seguinte:

| Resultado | Resultado de doente | Cor | Interpretação | Medida subsequente |
|---|---|---|---|---|
| 1 | Negative | Verde | Negativo para *Aspergillus* | Registar resultado |
| 2 | Positive | Vermelho | Positivo para *Aspergillus* | Registar resultado |
| 3 | Invalid | Cinzento claro* | Falha do IAC na amostra | Repetir a amostra |
| 4 | Invalid | Cinzento claro* | Falha no controlo positivo ou negativo | Repetir a execução completa |

*Se o resultado for comunicado como ND, em cinzento claro, isto corresponde ao código de erro 3079, o resultado de fluorescência elevada em um ou mais canais. Se for registado um valor Ct de ≤36.0 no canal de *Aspergillus*, registe-o como positivo.

3.4 Para visualizar separadamente resultados de amostras individuais tanto de *Aspergillus* como de CAI, seleccione **Sample Results** (Resultados de amostras) na lista **Views** (Visualizações) e clique nos separadores individuais de cada alvo. Os resultados serão exibidos no mesmo formato que os **Patient Results** (Resultados de doente) mas para cada alvo individual.

3.5 Se uma amostra de doente apresentar um resultado inválido, tal deve-se a um resultado de IAC falhado (indicado por Não resolvido no separador **Sample Results** (Resultados de amostras)); repita a reacção (mais os controlos positivo e negativo). Se a reacção continuar a falhar, pode estar presente uma substância inibitória no padrão e os resultados negativos não são fiáveis.

3.6 Para exportar os dados da execução para permitir a transferência para outro computador, vá para a directoria **Tools** (Ferramentas) no topo do ecrã e seleccione **Data Management** (Gestão de dados), seguido por **Archive Run(s)** (Arquivar execução(ões)) do menu suspenso. Surgirá um ecrã de mensagem, clique em **Proceed** (Avançar). Seleccione a execução a ser arquivada assinalando a caixa à esquerda e clique em **OK**. Surgirá uma mensagem de aviso informando quantas execuções serão arquivadas; se este número estiver correcto, clique em **Proceed** (Avançar). Seleccione um destino para gravar o ficheiro da execução, p. ex., uma pen USB de dados. Clique em **Save** (Guardar) e anote o nome do ficheiro. Surgirá uma mensagem de aviso informando quantas execuções serão arquivadas; se este número estiver correcto, clique em **Proceed** (Avançar).

3.7 Para importar dados da execução, prossiga para a directoria **Tools** (**Ferramentas**) no topo do ecrã e seleccione **Data Management** (**Gestão de dados**), seguido por **Retrieve run(s)** (**Extrair execução(ões)**) do menu suspenso. Surgirá um ecrã de mensagem, clique em **Proceed** (Avançar). Vá para **Look In:** (Ver em:) e seleccione o dispositivo de armazenamento utilizado para o arquivo dos dados da execução (ver secção 3.4 acima). Seleccione o ficheiro da execução a ser extraído e clique em **Open** (Abrir). Outro ecrã surgirá indicando que seleccione a execução que deseja extrair. Seleccione a execução a ser extraída e clique em **OK**. Surgirá um ecrã de mensagem informando quantas execuções serão extraídas; se este número estiver correcto, clique em **Proceed** (Avançar).

3.8 Se também for necessária uma cópia em papel, clique em **Report** (Relatório) e **Print** (Imprimir).

## 4. Resolução de problemas

### 4.1 O controlo negativo gerou um sinal positivo no canal FAM:

- Ocorreu contaminação durante a preparação. Os resultados de toda a execução não são fiáveis como sendo precisos.

→ Repita toda a execução, tendo muito cuidado ao adicionar os padrões, em particular o controlo positivo (Tubo 4), para assegurar que não ocorre contaminação cruzada.

→ Certifique-se de que a área de trabalho e os instrumentos estão adequadamente descontaminados antes e depois de utilizar.

- O controlo negativo foi posicionado incorrectamente no equipamento.

→ Tome cuidado para que os tubos de reacção fiquem colocados nos sítios específicos.

**4.2 O valor Ct de IAC do controlo negativo não se situa dentro do intervalo aceitável:**

- A PCR foi inibida.

→ Certifique-se de que a área de trabalho e os instrumentos estão perfeitamente secos após a utilização de agentes de descontaminação, antes da preparação da PCR.

- As condições de conservação do kit não cumpriram as instruções na secção Conservação destas instruções de utilização ou o kit expirou.

→ Verifique se foram seguidas as condições de conservação correctas do kit. Verifique o prazo de validade dos reagentes (ver caixa do kit / rótulo da bolsa) e repita com um kit dentro do prazo de validade, se necessário.

- O reagente do Tubo 1 ou 2 não foi adicionado à reacção da PCR ou foi adicionada a quantidade a dobrar do Tubo 2.

→ Repita a execução tendo cuidado na fase de preparação. Este tipo de erros pode ser detectado ao observarem-se níveis mais altos ou mais baixos de líquido num tubo de reacção, comparativamente aos outros.

**4.3 O controlo positivo está negativo:**

- As condições de conservação do kit não cumpriram as instruções na secção Conservação destas instruções de utilização ou o kit expirou.

→ Verifique se foram seguidas as condições de conservação correctas do kit. Verifique o prazo de validade dos reagentes (ver caixa do kit / rótulo da bolsa) e repita com um kit dentro do prazo de validade, se necessário.

- Ocorreu um erro durante o passo 1.12 e o padrão do controlo positivo (Tubo 4) foi colocado no tubo de reacção errado.

→ Repita a execução tendo muito cuidado na fase de preparação. Este tipo de erros pode ser detectado ao observar um nível mais alto de líquido num tubo de reacção e um nível mais baixo noutro, comparativamente ao normal.

- O reagente do Tubo 1 ou 2 não foi adicionado à reacção.

→ Repita a execução tendo cuidado na fase de preparação. Este tipo de erros pode ser detectado ao observarem-se níveis mais baixos de líquido neste tubo de reacção, comparativamente aos outros.

- O controlo positivo foi posicionado incorrectamente no equipamento.

→ Tome cuidado para que os tubos de reacção fiquem colocados nos sítios específicos.

**4.4 Amostra(s) de doentes apresenta(m) Resultado 3 - "Inválido":**

- É provável que a(s) amostra(s) clínica(s) extraída(s) contenha(m) inibidores da PCR.

→ Recomenda-se que o DNA de amostras clínicas seja extraído utilizando o kit de Extracção de DNA Fúngico MycXtra·

**4.5 Não existem resultados para qualquer canal com amostras ou controlos:**

- As condições de conservação do kit não cumpriram as instruções na secção Conservação destas instruções de utilização ou o kit expirou.

→ Verifique se foram seguidas as condições de conservação correctas do kit. Verifique o prazo de validade dos reagentes (ver caixa do kit / rótulo da bolsa) e repita com um kit dentro do prazo de validade, se necessário.

- O equipamento utilizado não funciona correctamente.

→ Verifique se o seu equipamento de PCR em tempo real tem o histórico de manutenções actualizado e se foi totalmente calibrado conforme descrito no Guia de Instalação e Manutenção.

- Foi utilizado um ficheiro de protocolo incorrecto durante a configuração do software.

→ Consulte a Secção 2 e seleccione o ficheiro de protocolo correcto, conforme especificado para cada tipo/versão de software, do CD-ROM do Protocolo Myconostica. Só pode ser carregado o ficheiro apropriado para o software. Repita a execução utilizando o ficheiro de protocolo correcto.

Se tiver mais dúvidas ou problemas ou se tiver problemas, contacte o Apoio Técnico (productsupport@lab21.com)

## Características e limitações do desempenho

### Sensibilidade analítica

Com o protocolo descrito acima, e os padrões de PCR gerados na Myconostica, o limite do branco (LoB) para MycAssay™ Aspergillus foi determinado como sendo um Ct de 38,0, enquanto o limite de detecção (LoD) foi determinado como sendo <50 cópias de DNA alvo. Isto foi determinado utilizando a estirpe AF293 de *Aspergillus fumigatus* a partir da qual o genoma foi totalmente sequenciado. Sabe-se que existem 37 cópias do alvo dentro do genoma, determinadas por mapeamento óptico[14] e, por conseguinte, 50 cópias do alvo representam aproximadamente 1,3 genomas.

### Especificidade e selectividade analítica

A especificidade analítica foi testada com DNA extraído a partir de 15 espécies diferentes de *Aspergilli*, incluindo várias estirpes de cada *A. fumigatus*, *A. niger*, A*. terreus*, e *A. nidulans*. Os sinais detectados acima do LoB foram registados como resultado positivo.

Todos os 15 *Aspergillus* spp. analisados deram positivo no ensaio. Além dos anteriormente mencionados, estão incluídos A. flavus, A. versicolor, *A. glaucus, A. sclerotiorum, A. niveus, A. lentulus, A. unguis, A. candidus, A. wentii, A. tubingensis* e *A. foetidus*.

O DNA genómico extraído a partir de *Penicillium* spp. também gerou resultados positivos. Tal deve-se ao facto das sequências dos alvos moleculares serem grandemente conservadas entre *Aspergillus* e *Penicillium*. Por conseguinte, deve notar-se que um resultado positivo neste ensaio pode ser o resultado de infecção por *Penicillium* e não por *Aspergillus*.

A selectividade analítica foi testada com DNA extraído de uma variedade de espécies fúngicas e não-fúngicas diferentes. As espécies seguintes não apresentaram um resultado positivo:
*Alternaria alternata Blastomyces capitatus, Candida albicans, C. glabrata, C. parapsilosis, C. tropicalis, Cladosporium spp., Cryptococcus neoformans, Doratomyces microsporus, Fusarium solani, Histoplasma capsulatum, Pneumocystis jirovecii, Rhizomucor pusillus, Rhodotonila rubra, Saccharomyces cerevisiae, Scedosporium apiospermum, S. prolificans, Sporothrix schenkii, Trichosporon capitatum.* As espécies bacterianas seguintes não apresentaram um resultado positivo: *Bordetella pertussis, Corynebacterium diphtheriae, Escherichia coli, Haemophilus influenzae, Lactobacillus plantarum, Legionella pneumophila, Moraxella catarrhalis, Mycoplasma pneumoniae, Neisseria meningitidis, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae, S. pyogenes, S. salivarius.*

O DNA genómico humano não apresenta um resultado positivo com este ensaio.

### Reprodutibilidade e repetibilidade

A repetibilidade e a reprodutibilidade foram determinadas por 5 operadores diferentes que analisaram um painel com ocultação de 7 padrões diferentes, em triplicado. As experiências foram realizadas utilizando 3 lotes de fabricação diferentes do kit MycAssay™ Aspergillus, em 3 equipamentos diferentes situados em 2 locais diferentes no Reino Unido.

Os resultados foram analisados contra o limite do branco (LoB) e o *cut-off* clínico (CCO). Com uma concentração de 3 vezes o limite de detecção (LoD), os resultados de 100% de todas as amostras analisadas estavam em concordância (positivo) com o LoB e 91% das amostras estavam em concordância no CCO. Com concentrações superiores a 3 x LoD, os resultados de 100% de todas as amostras estavam em concordância tanto com CCO como LoB. Relativamente aos padrões negativos, todas as amostras analisadas foram negativas para CCO.

### Substâncias interferentes (contra-indicações para a utilização)

Os compostos seguintes foram analisados com concentrações clinicamente relevantes e considerados como não inibindo o ensaio: acetilcisteína, anfotericina, dipropionato de beclometasona, budesonida, colistimetato de sódio, propionato de fluticasona, fumarato de formoterol di-hidratado, brometo de ipratrópio, lidocaína, manitol, sulfato de salbutamol, salmeterol, cloreto de sódio, cromoglicato de sódio, terbutalina, tobramicina.

[14] Nierman WC, Pain A, Anderson MJ, et al. (2005). Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigates.* Nature: 438: 1151-6.

## Avaliação do desempenho

Para avaliar o desempenho do kit MycAssay™ Aspergillus em amostras clínicas foram utilizadas amostras respiratórios (BAL), colhidas em 2 hospitais, extraídas com o kit MycXtra® e conservadas. Foram feitas comparações tanto com o diagnóstico clínico como com a cultura.

O valor de *cut-off* com um Ct de 36,0 foi estabelecido a seguir à análise de um conjunto de dados de amostras provenientes de centros diferentes e de populações de doentes diferentes. Os *cut-offs* diferentes foram avaliados relativamente à probabilidade de diferenciamento entre estado patológico e estado não patológico.

**PCR vs Diagnóstico clínico**

| | Positivo clínico | Negativo clínico | | |
|---|---|---|---|---|
| PCR positiva | 31 | 1 | 0.97 | PPV |
| PCR negativa | 2 | 10 | 0.83 | NPV |
| | 0.94 | 0.91 | | |
| | Sensibilidade | Especificidade | | |

**PCR vs Cultura de Aspergillus**

| | Cultura positiva | Cultura negativa | | |
|---|---|---|---|---|
| PCR positiva | 29 | 3 | 0.91 | PPV |
| PCR negativa | 2 | 10 | 0.83 | NPV |
| | 0.94 | 0.77 | | |
| | Sensibilidade | Especificidade | | |

Das amostras testadas, 0,8% continham inibidores da PCR, conforme indicado pelo IAC, a seguir à extracção com o conjunto MycXtra®.

## Relatório clínico

NOTA: Na análise do relatório de resultados, assegure-se que está utiliza o protocolo correcto. Para amostras respiratórias, deve utilizar-se o MycAssay Aspergillus Dx1,7b v1.3 ou o MycAssay Aspergillus v1_3. O protocolo SERUM MycAssay Asp v1 deve ser utilizado apenas em conjunto com o MycAssay Aspergillus SmartCycler Serum IFU (referência: 030-169). A utilização de um protocolo errado conduz a resultados inválidos.

O kit MycAssay™ Aspergillus foi concebido como uma ajuda no diagnóstico. Os resultados têm de ser contextualizados na doença clínica do doente e noutros resultados de análises de diagnóstico.

Os seguintes são relatórios recomendados, dependendo cada um da interpretação do resultado do ensaio:

Resultado n.º 1
"*Aspergillus* spp. não detectado."

Resultado n.º 2
"*Aspergillus* spp. detectado. Resultado positivo. Este ensaio também detecta *Penicillium* spp."

Resultado n.º 3
"Análise falhada; presença de inibidores ou de outra substância desconhecida."

## Limites do procedimento

- O limite principal deste procedimento relaciona-se com a qualidade da amostra principal:
  - Se a amostra for muito pequena ou se não tiver sido colhida na área afectada do pulmão, a análise será menos sensível e pode ser falsamente negativa.
  - As amostras da BAL devem ser centrifugadas antes da extracção do DNA do sedimento.
  - Os dados demonstraram igualmente que a redução no volume do sobrenadante utilizado no processo de extracção, alcançada pelo passo de centrifugação, diminui a proporção de inibidores que entram no sistema.

- Resultados positivos falsos são possíveis se o agente infectante for *Penicillium* spp., que não pode ser diferenciado de *Aspergillus* spp. mediante a utilização deste kit.

- Embora o procedimento de extracção de DNA fúngico MycXtra™ tenha sido concebido para remover os inibidores da PCR, nem todos os fármacos ou populações de doentes foram avaliados.

- O procedimento não foi totalmente avaliado em esputo nem em amostras induzidas com solução salina ou amostras provenientes de crianças.

- Podem ser obtidos resultados positivos falsos provenientes da contaminação externa da amostra ou da análise original. Essa contaminação pode surgir do ar contaminado com *Aspergillus*, uma técnica experimental fraca no que se refere ao controlo positivo ou contaminação externa (especialmente pipetador) com DNA de *Aspergillus*.

- Uma vez que um resultado positivo verdadeiro pode ser obtido de doentes que estejam transitoriamente ou persistentemente colonizados com *Aspergillus* spp., é necessária a avaliação clínica na interpretação dos resultados da análise, no contexto da doença.

## AUTORIZAÇÃO

TopTaq™ Hot Start é fornecido por QIAGEN. QIAGEN® é uma marca comercial registada da Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha.

Este produto é comercializado sob a licença do *Public Health Research Institute*, Newark, New Jersey, EUA e pode ser utilizado sob os direitos de patente do PHRI apenas para o diagnóstico humano *in vitro*.

SmartCycler® é uma marca comercial registada da Cepheid, 904 Caribbean Drive, Sunnyvale, CA, 94089, EUA.

Parte deste produto está coberta por uma licença exclusiva a um pedido de patente detido pelo Fred Hutchinson Cancer Centre, Seattle, EUA.

IVD

Lab21,184 Cambridge Science Park,
Cambridge CB4 0GA , United Kingdom.
Telephone: +44 (0) 1638 552 882 Facsimile: +44 (0) 1638 552 375
Email: productsupport@lab21.com

CE